

# ParoCheck®

Erster DNA-Chip zum Nachweis von Parodontitis assoziierten Bakterienarten

# Wissenschaftlicher Hintergrund

## Parodontitis

Entstehung und Progression parodontaler Entzündungsprozesse sind in der Regel auf eine Verschiebung des mikrobiellen Keimspektrums in der Mundhöhle, speziell im subgingivalen Bereich zurückzuführen.

Während sich die „gesunde“ orale Mikroflora vorwiegend aus Gram-positiven fakultativen Anaerobiern zusammensetzt, überwiegen bei einer Parodontitis die Gram-negativen Anaerobier.

Wichtige Ursache für die Ausbildung von Parodontiden ist u.a. eine mangelnde Mundhygiene, die sich zunächst in Form einer Gingivitis manifestiert, bei der es zu einer übermäßigen Besiedlung des Sulkus gingivae durch infektiöse Bakterien kommt. Bleibt eine Gingivitis unbehandelt und schreitet auch die Verschiebung des bakteriellen Keimspektrums zu Gunsten der anaeroben Bakterien weiter fort, kann die Infektion auf das gesamte Parodontium übergreifen und zur Ausbildung einer Parodontitis führen. Neben einer mangelhaften Mundhygiene

wird auch eine vorübergehende Schwächung des Immunsystems z.B. durch:

- Stress
- Rauchen
- Medikation
- virale oder bakterielle Infektion etc.

als eine mögliche Ursache einer parodontalen Entzündung diskutiert. Des Weiteren spielen auch genetische Dispositionen insbesondere bei der Ausbildung aggressiver Parodontiden eine wesentliche Rolle.

## Parodontalpathogenes Keimspektrum

Während sich die klinische Diagnostik in der Vergangenheit darauf beschränkte, die bedeutsamsten 4 bzw. 5 Leitkeime wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* (früher *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* in subgingivalen Plaques nachzuweisen, sind wir heute durch die Entwicklung besserer Nachweistechiken dazu in der Lage, weitere wichtige

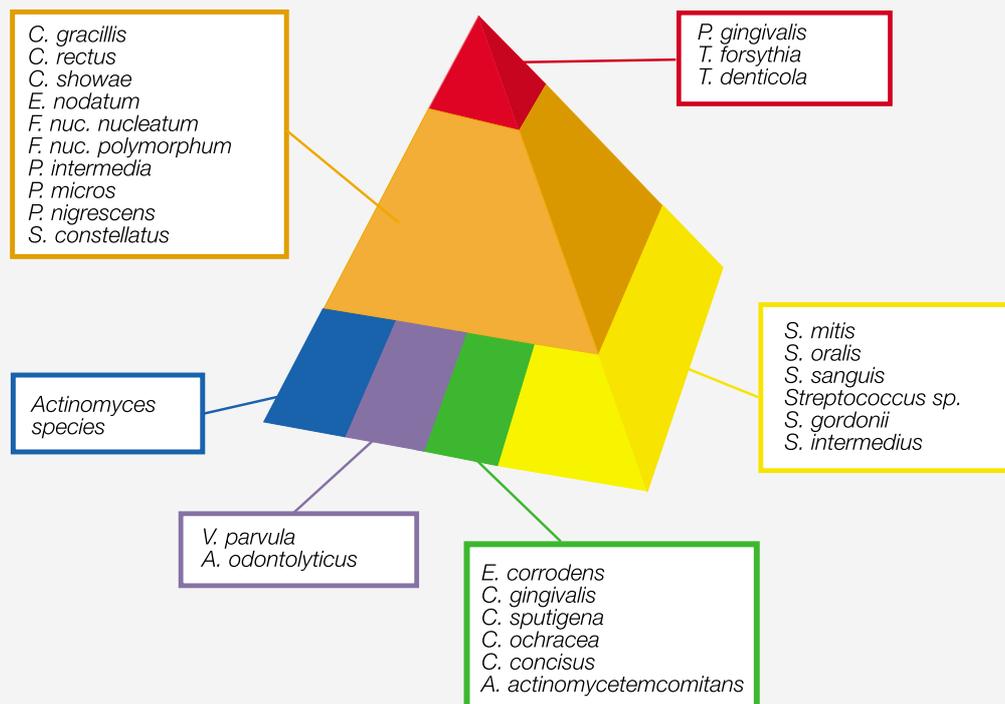


Abb. 1

Bakterielle Komplexe des subgingivalen Plaques (adaptiert nach Socransky & Haffajee: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000, Vol 28, 2002, 12-55)

## Nachweisbare Parodontalpathogene mit ParoCheck® Kit 10

<b>Porphyromonas gingivalis</b>	<b>Campylobacter rectus/showae</b>	<b>Actinobacillus actinomycetemcomitans a, b, c</b>
<b>Tannerella forsythia</b>	<b>Fusobacterium nucleatum ssp.</b>	<b>Eikenella corrodens</b>
<b>Treponema denticola</b>	<b>Peptostreptococcus micros</b>	<b>Actinomyces viscosus</b>
	<b>Prevotella intermedia</b>	

## Nachweisbare Parodontalpathogene mit ParoCheck® Kit 20

<b>Porphyromonas gingivalis</b>	<b>Peptostreptococcus micros</b>	<b>Actinobacillus actinomycetemcomitans a, b, c</b>
<b>Tannerella forsythia</b>	<b>Prevotella intermedia</b>	<b>Campylobacter concisus</b>
<b>Treponema denticola</b>	<b>Prevotella nigrescens</b>	<b>Capnocytophaga sp.</b>
<b>Campylobacter gracilis</b>	<b>Streptococcus constellatus Gruppe</b>	<b>Eikenella corrodens</b>
<b>Campylobacter rectus/showae</b>	<b>Actinomyces odontolyticus</b>	<b>Streptococcus mitis Gruppe</b>
<b>Eubacterium nodatum</b>	<b>Veillonella parvula</b>	<b>Streptococcus gordonii Gruppe</b>
<b>Fusobacterium nucleatum ssp.</b>		<b>Actinomyces viscosus</b>

Keime kostengünstig qualitativ zu bestimmen und in den therapeutischen Ansatz einzubeziehen.

Tatsache ist, dass mit den sog. Leitkeimen oft Gruppen weiterer Bakterienspezies assoziiert sind, die ein kompliziertes Netzwerk von Stoffwechselprodukten miteinander verbindet und die erst im Zusammenspiel (Komplex) zu einer Erhöhung der Pathogenität führen (Abb. 1).

„Cluster“ und „community“ Analysen deuten auf die Existenz von insgesamt sechs verschiedenen Gruppen hin, die sich wie folgt zusammensetzen:

**Blauer Komplex:** Actinomyceten

**Gelber Komplex:** Streptokokken

**Grüner Komplex:** Eikenella corrodens, Capnocytophaga spezies, Actinobacillus actinomycetemcomitans serotype a, Campylobacter concisus

**Violetter Komplex:** Veillonella parvula und Actinomyces odontolyticus

**Oranger Komplex:** Fusobakterium spezies und ssp, Peptostreptococcus micros, Prevotella nigrescens, Pre-

otella intermedia, Campylobacter spezies, Eubakterium nodatum und Streptococcus constellatus

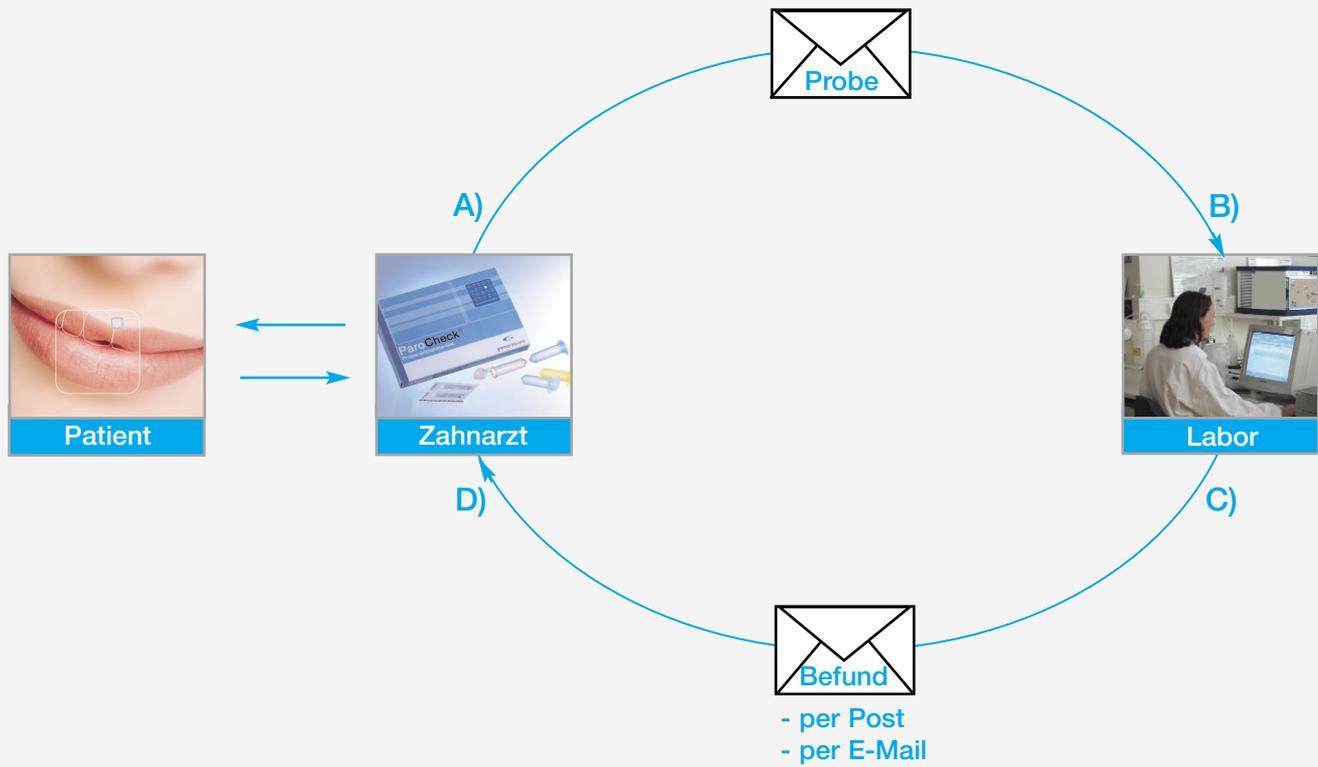
**Roter Komplex:** Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia und Treponema denticola.

ParoCheck® ist der erste DNA-Chip, mit dem dieses erweiterte Bakterienspektrum simultan qualitativ nachgewiesen werden kann: während Sie mit ParoCheck® Kit 10 alle Vertreter des „roten“ Komplexes und einige Vertreter des „orangen“ Komplexes nachweisen können, erfasst ParoCheck® Kit 20 darüber hinaus fast alle Vertreter des „orangen“ Komplexes sowie die Leitkeime anderer Komplexe (siehe Tabelle).

# Nachweis

ParoCheck® ist der erste DNA-Chip zum qualitativen Nachweis von Parodontitis assoziierten Bakterienarten. Im Gegensatz zu herkömmlichen Nachweismethoden erfolgt die Analyse von Biochips in Computer gesteuerten optisch hochauflösenden Microarray Scannern, die eine objektive Messung der Proben gewährleisten.

Die digitale Auswertung von Biochips ermöglicht eine einfache Archivierung sowie eine schnelle Zustellung der Befunde via E-Mail. In Abb. 2 sind Arbeitsablauf und Arbeitsaufwand mit dem ParoCheck® schematisch dargestellt und gliedern sich wie folgt:



- A) Probenentnahme und Versand
- B) Labordiagnostische Analyse und Auswertung des Keimspektrums
- C) Befunderstellung und Rücksendung
- D) Therapieempfehlung

Abb. 2 Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs und Arbeitsaufwand mit ParoCheck®

## A) Probenentnahme und Versand

Für die Probenentnahme erhalten Sie ein Entnahmeset, bestehend aus einem Auftragsformular, vier farbigen Reaktionsgefäßen und sterilen Papierspitzen. Obwohl die Probenentnahme schnell und einfach durchzuführen ist, sollten Sie folgende Punkte unbedingt beachten:

### Wahl der Probenentnahmestelle

Die meisten Markerkeime sind obligate oder fakultative Anaerobier, die nur eine begrenzte Toleranz gegenüber Luftsauerstoff haben. Aus diesem Grund sollten besonders tiefe Taschen für die subgingivale Probenentnahme in jedem Quadranten ausgewählt werden.

Außerdem sollten für die Probenentnahme akut blutende Taschen, z. B. aufgrund einer vorangegangenen Sondierung oder stark eiternde Stellen vermieden werden. Durch einen hohen Blut- und/oder Eiter-Gehalt wird der Anteil humaner DNA im Probenmaterial erhöht, wodurch es zu einer Verdünnung des bakteriellen Anteils kommt. Außerdem können inhibitorische Substanzen im Blut und/oder Eiter die Analyse negativ beeinflussen.

### Einzelprobe oder Mischprobe

#### Einzelprobe

Das Probenentnahmeset beinhaltet insgesamt vier farbige Röhrchen, sodass Sie insgesamt vier subgingivale Proben separat entnehmen und auswerten lassen können. Dies gewährleistet eine **individuelle Keimbestimmung** von insgesamt vier Zahnfleischtaschen und die Einschätzung des Risikos für Stützgewebe- und Knochenverlust an einer **spezifischen Stelle**.

Sollten Sie sich für diese Variante entscheiden, bitten wir Sie die Papierspitzen nach Probenentnahme in die farblich unterschiedlichen Röhrchen zu geben und auf dem Auftragsformular entsprechend individuell zu kennzeichnen.

#### Mischprobe

Für Mischproben werden subgingivale Proben aus verschiedenen Zahnfleischtaschen entnommen und für die Analyse in einem Reaktionsgefäß vereint. Diese

Variante liefert einen Mittelwert für die untersuchten Zahnfleischtaschen und ermöglicht eine **allgemeine Risikoabschätzung** für den Behandlungsverlauf.

Für diese Variante bitten wir Sie die subgingivalen Proben in einem Röhrchen zu vereinigen und auf dem beiliegenden Auftragsformular entsprechend zu kennzeichnen.

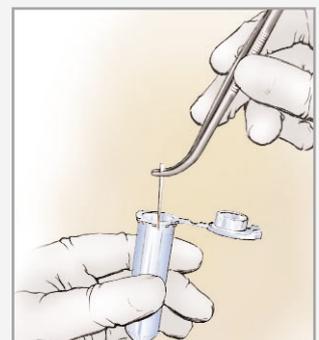
**In diesem Zusammenhang sollten Sie beachten, dass Ihnen der Preis pro Analyse, d.h. pro Röhrchen in Rechnung gestellt wird! Dabei ist es unerheblich, ob in einem Reaktionsgefäß nur eine (Einzelprobe) oder mehrere (Mischprobe) Proben enthalten sind.**

### Probenentnahme

- Nach Trockenlegung und Reinigung des supragingivalen Plaques den Entnahmeort mit Watterollen isolieren.
- Sterile Papierspitze mit Pinzette bis zum Taschenfundus einführen. 15 sec. in situ belassen.
- In Abhängigkeit der Probe (Einzel- oder Mischprobe) die sterilen Papierspitzen einzeln oder zusammen in die beschrifteten Transportröhrchen geben.



1. Probenentnahme



2. Probenversand



## B) Labordiagnostische Analyse und Auswertung des Bakterien-spektrums

ParoCheck® ist ein DNA Sondentest, der in Verbindung mit einer extrem sensitiven und schnellen Hybridisierungstechnik, den sog. Biochips, eingesetzt wird. Diese erlauben eine wesentlich schnellere und exaktere Auswertung vorhandener parodontalpathogener Bakterien in der Probe. Das Testprinzip ist in Abbildung 3 skizziert und basiert auf dem Nachweis der keim-spezifischen 16S rRNA codierenden DNA. Nach Probenentnahme am Patienten wird die bakterielle DNA extrahiert. Im Folgenden wird ein ca. 300 Nukleotide langes DNA Fragment, der 16S rRNA codierenden DNA aller vorhandenen Bakterien der Probe, in Gegenwart eines hochkonservierten Primerpaares mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

Das Design der PCR wurde so gewählt, dass einzelsträngige DNA Fragmente entstehen, die mit Fluorophor Molekülen markiert sind. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der markierten Amplifikate an keimspe-

zifische DNA-Sonden, die auf dem Biochip fixiert sind. Nach der Hybridisierung kann die Analyse mit einem speziellen Microarray Scanner durchgeführt werden. Insgesamt 5 Kontrollsysteme verhindern falsch positive oder falsch negative Ergebnisse. Die Auswertung und Erstellung des „CheckReport™“ erfolgt mit Hilfe einer speziellen Analyse Software.

**Die Nachweisgrenze der ParoCheck® Analyse liegt bei  $10^3$  Kopien eines bakteriellen Genoms.**

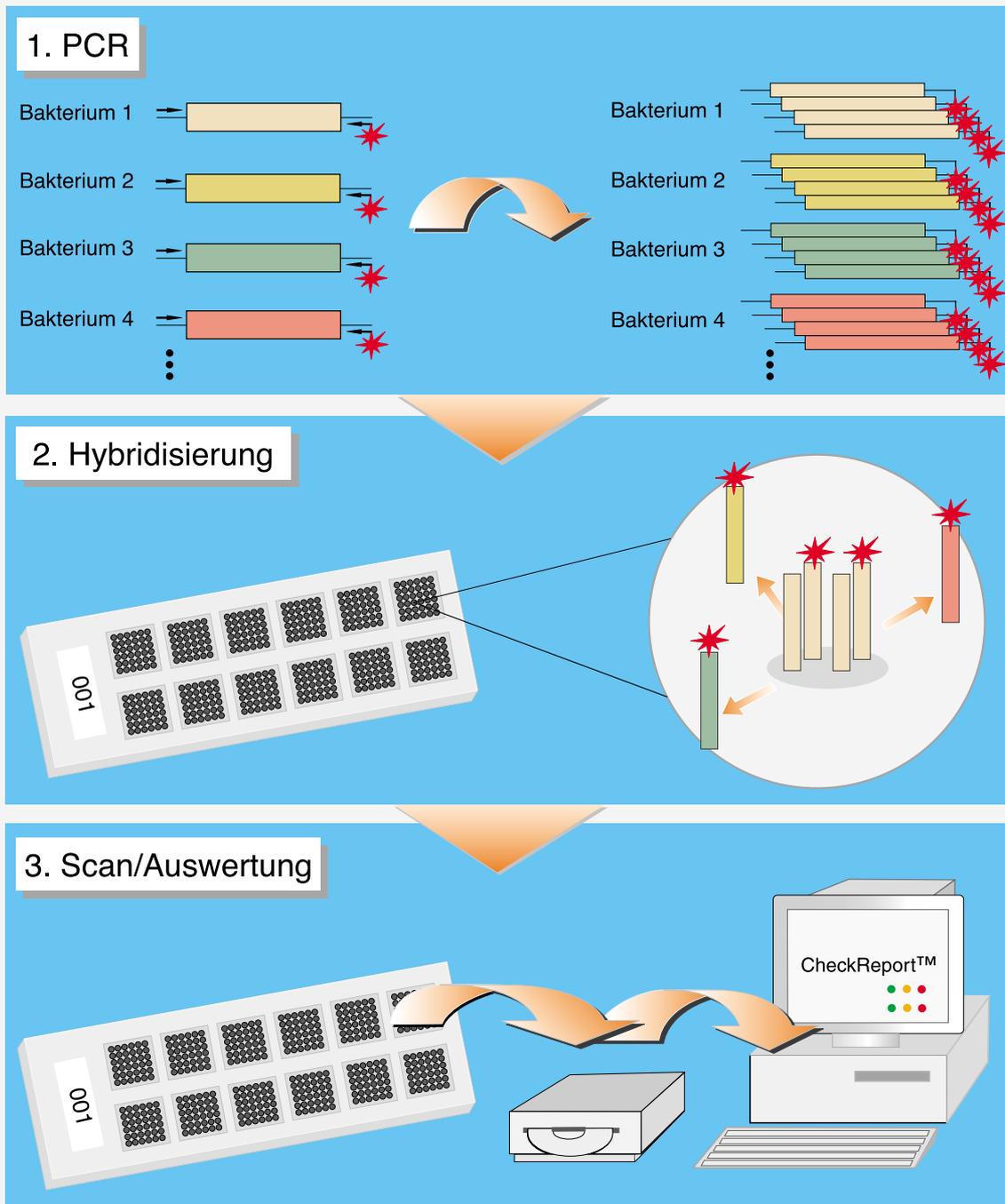


Abb. 3 Testprinzip des ParoCheck®

1. Nach Extraktion der bakteriellen DNA wird ein ca. 300 Nukleotide langes DNA Fragment, der 16S rRNA codierenden DNA aller vorhandenen Bakterien der Probe in Gegenwart eines hochkonservierten Primerpaares mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Das Design der PCR führt zu einzelsträngigen DNA Fragmenten, die durch Fluorophor Moleküle markiert werden.
2. Die markierten Sonden hybridisieren an komplementäre Sequenzen, die auf dem Chip verankert sind. Der Nachweis der Parodontalpathogene erfolgt in Form von fünfmal Bestimmungen. Falschgebundene bzw. überschüssige Sonden werden in den folgenden Waschsritten weggespült.
3. Die gebundenen und markierten Sonden werden in speziellen Microarray Scannern detektiert. Die Auswertung der Biochips erfolgt mit Hilfe der CheckReport™ Software.

## C) Befunderstellung und Zusendung

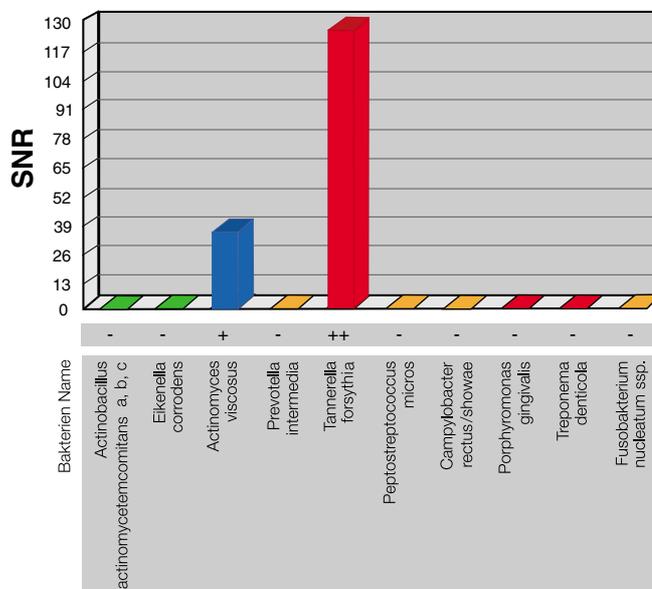
Die Auswertung des ParoCheck® erfolgt mit Hilfe Computer gesteuerter optischer Geräte, sog. Scannern, die eine exakte und objektive Messung ermöglichen. Für jedes Bakterium sind auf dem Biochip jeweils fünf Messpunkte vorhanden, wodurch das Risiko einer Falschmessung minimiert wird. Die qualitative Bestimmung der parodontalpathogenen Bakterien ermöglicht außerdem den Therapieverlauf objektiv zu beurteilen

und das Risiko für einen Stützgewebe- und Knochenverlust zu reduzieren.

Neben der qualitativen Bestimmung des Keimspektrums, enthält der Labor-Befund außerdem ein auf das individuelle Keimspektrum abgestimmtes Therapieschema (Abb. 4). Aufgrund der digitalen Auswertung können alle Ergebnisse einfach archiviert und elektronisch zugestellt werden. Dadurch erhalten Sie den Befund wesentlich schneller als bisher.

### Nachweis parodontalpathogener Markerkeime (ParoCheck® Kit 10)

Die eingesandten Plaqueproben wurden mit einem DNA-Chip zum qualitativen Nachweis von Parodontitis assoziierten Keimen untersucht. Die Nachweisgrenze liegt bei  $10^3$  Keimen.



Untersuchungsergebnis und Therapieempfehlung:

Abb. 4 Auszug aus dem CheckReport™

## D) Therapieempfehlung

Ziel der Parodontalbehandlung muss es sein, parodontalpathogene Bakterien aus den infizierten Geweben dauerhaft zu eliminieren. In vielen Fällen ist allein durch sorgfältiges mechanisches oder chirurgisches Vorgehen eine langfristige stabile parodontale Situation nicht zu erreichen.

Die hohe Rezidivrate nach konventioneller PAR-Behandlung hat gezeigt, dass rein mechanische Maßnahmen für einen dauerhaften Therapieerfolg häufig nicht ausreichen. Es ist unbestreitbar, dass neben der mechanischen Therapie SRP, adjuvante Antibiosen, sei es systemisch oder lokal durch Einbringen eines Local Delivery Devices (LDS), die Therapie gerade bei aggressiven marginalen Parodontitiden nachhaltig optimieren können. Die Auswahl und der Einsatz geeigneter Antibiotika im Rahmen einer PAR-Behandlung setzt jedoch eine möglichst genaue Kenntnis über die Zusammensetzung des Keimspektrums voraus. Viele Therapieversager und die Ausbreitung bakterieller Resistenzen unterstützen diese Tatsache.

Mit ParoCheck® haben Sie die Möglichkeit ein breites Spektrum parodontalpathogener Bakterien zu erfassen und die Antibiotika-Auswahl gezielt auf das individuelle Keimspektrum des Patienten abzustimmen. Anhand der nachgewiesenen Bakterien wird ein entsprechendes Therapieschema als Vorschlag für eine weitere wirksame Behandlung erstellt. Hierbei werden ausschließlich Antibiotika herangezogen, für die gute antimikrobielle und klinische Wirkungen beschrieben wurden.

### Indikation für eine Antibiotikatherapie

Generell sollte bei der Applikation von Antibiotika in der Parodontitistherapie beachtet werden, dass diese nur in Verbindung mit einem supra- und subgingivalen Debridement sinnvoll sind. Die temporäre Desintegration des Biofilms ist eine wichtige Voraussetzung, um eine optimale Wirkung des Antibiotikums zu erzielen. Antibiotika sind also in der Parodontitistherapie als Unterstützung

und nicht als Ersatz von supra- und subgingivalem Debridement anzusehen.

Die DGP/DGZMK empfiehlt in ihrer Stellungnahme die mikrobiologische Diagnostik bei den folgenden Parodontitisformen:

- Aggressive Parodontitis
- Schwere chronische Parodontitis
- Parodontiden, die trotz Therapie progrediente Attachmentverluste aufweisen
- Parodontalabszess mit Tendenz zur Ausbreitung in die benachbarten Logen, Fieber und/oder ausgeprägter Lymphadenopathie
- Nekrotisierende ulzerierende Gingivitis oder Parodontitis mit ausgeprägter Allgemeinsymptomatik
- Mittelschwere bis schwere Parodontitis bei systemischen Erkrankungen bzw. bei Schwächung des Immunsystems.

# Abrechnungsempfehlung

Für neuere Verfahren zur Diagnostik und Therapie von Parodontopathien existiert keine explizite Abrechnungsgrundlage gemäß GOZ und GOÄ, da diese Verfahren erst nach in Kraft treten der GOZ 88 entwickelt wurden. Dies gilt auch für den ParoCheck® (Abb. 5).

Wird ein Patient mittels ParoCheck® auf das Vorhandensein von Parodontitis-Erregern untersucht, kann für die Berechnung dieser Leistung § 6 Abs. 2 GOZ herangezogen werden. „Selbständige zahnärztliche Leistungen, die erst nach In Kraft treten dieser Gebührenordnung aufgrund wissenschaftlicher Ergebnisse entwickelt werden, können entsprechend einer nach Art, Kosten- und Zeitaufwand gleichwertigen Leistung des Gebührenverzeichnisses für zahnärztliche Leistungen berechnet werden.“

Die Materialentnahme kann vom behandelnden Zahnarzt gemäß GOZ-Nr. 401 abgerechnet werden, wobei je Entnahmevorgang abgerechnet wird.

Hierbei sind verschiedene Abrechnungsvarianten möglich:

1) **Pro Zahn** interessiert nur **eine Stelle** (z.B. mesial): Geben Sie in diesem Fall drei Papierspitzen in den gleichen Taschenbereich, um möglichst viel Untersuchungsmaterial zu erhalten.

Für diesen Zahn können Sie abrechnen:  
1 x GOZ-Nr. 401

2) **Pro Zahn** interessieren **unterschiedliche Stellen** (z.B. mesial/distal, interrädikulär, vestibulär/oral):

Bei bestimmten pathogenen Gegebenheiten kann eine genaue Analyse der Taschenflora an unterschiedlichen Stellen der parodontalen Tasche im Bereich eines Zahnes interessieren. Geben Sie in diesem Fall die drei (max. auch fünf) Papierspitzen in die unterschiedlichen Taschenbereiche. Sie erhalten einen Gesamtüberblick und die Chance einen mikrobiologisch-aktiven Bereich in der parodontalen Tasche mit den Papierspitzen zu erfassen.

Für diesen Zahn können Sie abrechnen:  
3 bis 5 x GOZ-Nr. 401

Wird die Rechnung über den mikrobiologischen Test direkt durch das Labor dem Patienten zugesandt, so ist § 4 Abs. 5 GOZ zu berücksichtigen: „sollen Leistungen durch Dritte erbracht werden, die diese dem Zahlungspflichtigen unmittelbar berechnen, so hat der Arzt ihn darüber zu unterrichten“.

Begleitleistungen, wie Beratung, Therapiegespräche und Zahnreinigung sind so zusätzlich nach GOZ berechenbar.

## Auszug aus einer Liquidation gemäß § 6 Abs. 2 GOZ

Zahn	GOZ-Nr.	Leistung	Anzahl	Faktor	Euro
	001	Untersuchung	1	...	...
16, 26, 30, 38	405	Beläge entfernt	4	...	...
16, 26, 30, 38	401 analog*	Subgingivale Entnahme von Bakterien	4	...	...
		Kosten laut GOZ §3 und §4 Abs. 3			...
		<b>Gesamtkosten</b>			...

\* Berechnung auch analog einer anderen nach Art-, Kosten und Zeitaufwand gleichwertigen Leistung der GOZ

Abb. 5 Berechnung ParoCheck®. Quelle: Wuttig S. Neue Leistungen in der Parodontologie. Dental Magazin. 2003 März; 112-114.

**Eine Publikation der**  
**Greiner Bio-One GmbH**  
Maybachstraße 2  
D-72636 Frickenhausen  
Telefon: +49 (0) 70 22 / 9 48 - 0  
Telefax: +49 (0) 70 22 / 9 48 - 5 14  
E-Mail: [info@de.gbo.com](mailto:info@de.gbo.com)  
[www.gbo.com/bioscience](http://www.gbo.com/bioscience)

Für Anfragen und Bestellungen besuchen Sie bitte unsere Internetseite  
[www.gbo.com/bioscience/parochek](http://www.gbo.com/bioscience/parochek) oder kontaktieren Sie folgendes Labor:

